



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 350**

51 Int. Cl.:
C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03789658 .6**

96 Fecha de presentación : **31.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1603938**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Cuerpos de inclusión como antígenos para la vacunación oral de animales frente a VPPC.**

30 Prioridad: **31.12.2002 PL 358082**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2009

73 Titular/es: **Instytut Biotechnologii i Antybiotyków
ul. Staroscinska 5
02-516 Warszawa, PL**

72 Inventor/es: **Plucienniczak, Andrzej;
Saczynska, Violetta;
Kesik, Malgorzata;
Porebska, Anna;
Szewczyk, Boguslaw y
Ficinska, Jolanta**

74 Agente: **No consta**

ES 2 328 350 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cuerpos de inclusión como antígenos para la vacunación oral de animales frente a VPPC.

5 **Campo de la invención**

El tema de la invención es una vacuna oral y los medios y procedimientos usados en su producción. En general, la invención se refiere a un procedimiento para inducir una reacción inmunológica, que comprende la administración de una vacuna a través de tubo digestivo. Los temas de la invención sirven para producir vacunas orales frente a la enfermedad causada por un pestivirus, especialmente frente a la peste porcina clásica.

Antecedentes de la invención

15 La peste porcina clásica está causada por el virus de la peste porcina clásica (VPPC, también conocido en el pasado como virus de la peste porcina). La peste porcina clásica es una de las enfermedades causadas por pestivirus pertenecientes a la familia Flaviviridae. Los pestivirus atacan a animales de la familia Suidae (cerdo) ya varias especies de rumiantes (vacas, ovejas y cabras), así como a muchas especies de animales salvajes. La peste porcina clásica se describió por primera vez en 1833 en Ohio. Desde entonces se han ampliado considerablemente en todo el mundo, convirtiéndose en uno de los factores económicos más limitantes en la cría de cerdos. En 1997, durante una epidemia de peste porcina en España, se perdieron más de un millón de animales. Las pérdidas ascendieron a más de 140 millones de dólares. Hasta la fecha, esta enfermedad no se ha detectado en apenas 16 países. La organización mundial *Office International des Epizooties*, incluye esta enfermedad en su lista A como una de las 15 enfermedades animales más peligrosas. Dependiendo de la virulencia del virus, la evolución de la enfermedad puede ser: aguda, moderada o leve. Durante una crisis aguda, los animales presentan fiebre alta, alternancia de estreñimiento y diarrea, leucopenia (apoptosis de leucocitos), lesiones cutáneas y una fuerte inmunodepresión. En la mayoría de los animales, el resultado de un caso agudo de peste porcina es la muerte. Un caso leve puede cursar asintóticamente. Y lo que es más, la enfermedad tiene más bien un periodo largo de incubación, de 2 a 14 días, lo que complica adicionalmente el control de una epidemia. La forma más frecuente de transmisión de la enfermedad es el contacto entre animales enfermos y sanos. La transmisión física también es posible por personas, aves e insectos, en utensilios agrícolas, pienso, vehículos, ropa, etc. La infección se produce a través de la vía nasoesofágica. Hasta la fecha, se ha demostrado que es imposible tratar la enfermedad. Tras el descubrimiento del patógeno, todos los rebaños en un radio de 25 km del epicentro de la epidemia deben ser sacrificados. El hecho de que el virus puede sobrevivir fuera del organismo hospedador durante un mes demuestra su resistencia. Actualmente existen tres vacunas: una basada en la cepa C viva atenuada del virus [Terpstra y col., *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1990; 97 (2): 77-9], otra basada en un clon de ADNc infectivo modificado [Meyers y col. *J. Virol.*, 1996; 70 (3): 1588-95], así como “vacunas marcador” basadas principalmente en la glucoproteína E2 [van Rijn y col., *Vaccine* 1999; 17 (5): 433-40].

40 La glucoproteína E2, así como las glucoproteínas E0 y E1, constituyen la envoltura vírica del virus de la peste porcina. La virulencia del patógeno se neutraliza de forma más eficaz mediante anticuerpos dirigidos frente a epítopes de la proteína E2 (Weiland y col. 1992. *J. Virol.* 66:3677). La proteína E2 posee epítopes característicos en el extremo N-terminal que son reconocidos por anticuerpos. Estos son los cuatro dominios A, B, C y D, expuestos en el exterior de la membrana, a la que la proteína se ancla con el extremo C-terminal (van Rijn y col., 1994. *J. Virol.* 68:3934).

45 A diferencia de la inmunización parenteral, las vacunas orales aseguran no sólo la inmunidad sistémica, sino también la inmunidad de membranas mucosas, lo que es especialmente importante para prevenir la infección por parásitos gástricos. El creciente interés en las vacunas orales también está alimentado por la facilidad de aplicación, lo que facilita la administración a gran escala (Richter L., Kipp B.B., 1999. *Curr. Top Microbial. Immunol.*, 240. 159-176). Se han realizado los primeros intentos para producir vacunas orales. La descripción WO 00/37610 muestra vectores para la fabricación de polipéptidos inmunogénicos, como HBsAg, en tejidos vegetales comestibles. Las plantas transgénicas producidas de esta forma se usan para fabricar vacunas orales.

50 Sin embargo, estas no están extensas de fallos. La dificultad estriba de asegurar las dosis adecuadas y precisas de antígeno en la vacunación. El nivel de antígeno sintetizado varía en diferentes tejidos y muestras de las plantas transgénicas obtenidas.

Las descripciones US 5.770.214, US 5.811.105 y US 5.804.194 está relacionadas con la aplicación de cepas atenuadas de *Salmonella Typhi* como vacunas orales.

60 La descripción US 6.290.962 publicada el 18 de septiembre de 2001 describe un procedimiento para inducir una respuesta inmune frente a *Helicobacter* basada en la administración de una cantidad inmunogénica de un antígeno, que era una ureasa de *Helicobacter* o su subunidad. Vacunas orales similares que contienen una proteína ureasa recombinante de *Helicobacter* producida en células de *E. coli* son los temas de las patentes polacas PL 179.149 y PL 174.448.

65 Una relativa falta de experiencia en inmunización oral y el destino incierto del antígeno en el tubo digestivo hace que las condiciones de esta forma de inmunización estén peor definidas que la vacunación parenteral. Adicionalmente, la inmunización oral conlleva el riesgo de inducción de tolerancia basada en la tolerancia a alimentos (McGhee J.R. y

ES 2 328 350 T3

col., 1999. en: Mucosal Immunology (Ogra P.L., Lamm M.E., Bienenstock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J. R., red), págs. 485-505. Academic Press).

5 La descripción WO 98/32427 publicada el 30 de julio de 1998 describe un polímero usado para preparar vacunas orales recubiertas, con liberación retardada del principio activo.

Independientemente de la vía de administración, la forma del antígeno garantiza su grado de inmunogenicidad.

10 La adquisición de inmunidad como resultado de la vacunación requiere el mantenimiento de la pauta correcta de inmunización, lo que incluye factores como la descripción precisa de factores como el tamaño y número, así como la frecuencia de dosis individuales. El pH ácido de los jugos gástricos, las enzimas proteolíticas y la peristalsis intestinal hacen que las dosis efectivas en la vacunación oral sean mucho más altas que en la vacunación parenteral. Al mismo tiempo, sin embargo, la administración de una dosis excesivamente alta de antígeno provoca la tolerancia a alimentos mencionada anteriormente. Esto no significa que la aplicación de dosis bajas de antígeno no pueda inducir tolerancia a alimentos. Hasta la fecha no se han elucidado los mecanismos básicos que rigen este fenómeno y no se han ideado procedimientos convencionales para resolver el problema de la tolerancia inducida. Se cree que el fenómeno de tolerancia depende en cierto grado de los factores mencionados anteriormente, como el tamaño de la dosis, la pauta posológica y el tipo de antígeno (Tacket C.O., Mason H.S., 1999. Microbes and Infection 1. 777-783). En vista de la investigación actual las perspectivas de producir los adyuvantes apropiados, los componentes óptimos de la vacuna, las dosis eficaces y las pautas de vacunación oral parecen estar lejos (Makela P.H., 2000. FEMS Microbiology Reviews 24. 9-20).

15 Parece que el requisito previo para la inmunización a través de las membranas mucosas es una administración múltiple del antígeno en dosis varias veces superior a las dosis efectivas para la administración parenteral. Más preferiblemente son antígenos que forman grupos multiméricos. La justificación del uso de adyuvantes tampoco está clara. En el caso de vacunas de plantas comestibles, esto parece ser poco deseable, aunque para algunos antígenos puede ser esencial (Richter L., Kipp B.B., 1999. Curr. Top Microbiol. Immunol. 240. 159-176).

20 En resumen, debido a la naturaleza de las vacunas orales, parece que es mucho más difícil establecer un protocolo de inmunización gastrointestinal eficaz de lo que es para la inmunización que usa procedimientos tradicionales. Para cada medicamento en concreto, esto es un desafío único, asociado con un gran riesgo de fracaso.

25 Existen varios indicadores de la eficacia de la inmunización a través de membranas mucosas, como el tubo digestivo. Estos incluyen el nivel de anticuerpos específicos de antígeno secretados de la clase IgA (S-IgA) asociada con las membranas mucosas, el valor en suero de anticuerpos de las clases IgG e IgA, el perfil de anticuerpos de la clase IgG y el perfil de citocinas. Para determinar la inmunidad celular, se usan pruebas de citotoxicidad de linfocitos.

30 El genoma del VPPC es una cadena sencilla de 9,5 a 12,5 kpb y de polaridad positiva. La cadena contiene un marco de lectura que codifica una poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos. Esta última sufre un procesamiento cotraduccional y postraduccional dando lugar a las cuatro proteínas estructurales C, E0, E1, E2 y a proteínas no estructurales, es decir, proteasas virales. Aún no se conoce la estructura del virión. Se sabe que el virión es una partícula icosaédrica de aproximadamente 50 nm de diámetro y que está compuesta de una nucleocápside esférica y una envoltura. La nucleocápside está compuesta de muchas moléculas de proteína C, mientras que la envoltura está compuesta de fosfolípidos de membrana y las glucoproteínas de superficie E0, E1 y E2. Las proteínas forman homodímeros (E0 y E2) y heterodímeros (E1-E2) a través de puentes disulfuro. Sólo entonces se incorporan a la envoltura viral (Meyers G., Thiel H.J 1996. van Rijn P. A., van Gennip H. G. P., de Meijer E. J., Moormann R. J. M. 1993. Thiel H. J., Stark R., Weiland E., Rumenapf T., Meyers G. 1991). Las proteínas E1 y E2 poseen dominios transmembrana que las anclan a la membrana (van Rijn P. A., van Gennip H. G. P., de Meijer E. J., Moormann R. J. M 1993. van Rijn P. A., Miedema G. K. W, Wensvoort G, van Gennip H. G. P., Moormann R. J. M. 1994). Todas las glucoproteínas de la envoltura tienen propiedades inmunogénicas. Se piensa que la proteína E2 es el antígeno más potente, más potente que E0 y E1.

35 La descripción de la patente US 6.207.165 (publicada el 27 de marzo de 2001) describe una solución relativa a una vacuna que protege al cerdo de estados patológicos causados por enfermedades de las vías respiratorias y reproductoras. En esta solución se presenta una composición inmunogénica que induce una respuesta inmune frente al VPPC y que contiene un plásmido que codifica al menos una de las proteínas E1 o E2, la cual se expresa *in vivo* en la célula hospedadora.

40 La descripción de la patente US 5.965.134 (publicada el 12 de octubre de 1999) describe polipéptidos inmunogénicos de pestivirus, especialmente del VPPC y, en particular, la proteína no estructural p10 y vacunas y diagnósticos usando los polipéptidos o moléculas de ácido nucleico descritas.

Objetivo de la invención

45 A pesar de la investigación descrita anteriormente dedicada a la producción de una vacuna frente al VPPC, sigue existiendo la necesidad de producir herramientas eficaces para la fácil fabricación de vacunas eficaces que inmunicen frente a este virus.

En vista del estado de la tecnología presentado anteriormente, la finalidad de la presente invención es la producción de medicamentos especiales eficaces y de fácil obtención que se puedan aplicar en vacunaciones orales frente a la peste porcina clásica, lo que facilitaría la adquisición de inmunidad sistémica y de membranas mucosas. Los tratamientos según la presente invención debe ser fácil de aplicar y carecer de otras dificultades conocidas de la preparación y aplicación de vacunas. Esto último incluye los costes relativamente altos de la preparación del tratamiento y el peligro de intoxicación hematológica involuntaria durante la vacunación. Las vacunaciones orales según la presente invención deben asegurar una inmunización eficaz a través del tubo digestivo.

La siguiente finalidad de la presente invención es la producción de los medios que se pueden usar para producir una vacuna eficaz, fácil de administrar y fácilmente disponible frente a enfermedades causadas por un pestivirus, especialmente la peste porcina clásica. Un objetivo particular de la presente invención es la producción de proteínas recombinantes que contendrían antígenos seleccionados del virus de la peste porcina clásica y herramientas que facilitan su expresión en *E. coli*. Un objetivo particular de la presente invención es la producción de los medios que facilitan la producción de las proteínas recombinantes que podrían usarse para producir vacunas comestibles frente a enfermedades causadas por pestivirus, en particular frente a la peste porcina clásica.

Inesperadamente, en la presente invención se han conseguido dicho objetivo descrito y una solución a los problemas descritos en el estado de la tecnología.

Resumen de la invención

El tema de la presente invención es un polipéptido producido en un microorganismo genéticamente modificado que contiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la proteína E2 del pestivirus, en particular VPPC. Preferiblemente, está en forma de cuerpos de inclusión. Una realización preferida de la presente invención es un polipéptido según la presente invención que contiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la proteína E2 del pestivirus, en especial el VPPC, carente de fragmento transmembrana. En particular, preferiblemente, el polipéptido según la presente invención contiene la secuencia codificada por la secuencia que se presenta en la fig. 4 o en la fig. 5.

El tema de la presente invención también es la secuencia que codifica un polipéptido que contiene una secuencia nucleotídica, la cual codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína E2 del pestivirus, especialmente del VPPC. Preferiblemente, la secuencia según la presente invención contiene la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína E2 del pestivirus, especialmente del VPPC, carente de fragmento transmembrana y, especialmente la que se presenta en la fig. 4 o en la fig. 5.

El tema de la presente invención también es una construcción que contiene la secuencia que codifica un polipéptido, *caracterizada porque* es una secuencia que codifica un polipéptido según la presente invención, definida anteriormente. Preferiblemente, la construcción según la presente invención es un plásmido producido por la inclusión de la secuencia que codifica el polipéptido dentro de un plásmido pIGDM1 y, en especial preferiblemente el plásmido pIGCmT7.

El tema de la presente invención también es una célula bacteriana transformada con la construcción de expresión que contiene la secuencia que codifica un polipéptido, *caracterizada porque* la construcción contiene una secuencia según la presente invención definida anteriormente como la secuencia que codifica un polipéptido. Preferiblemente, la célula bacteriana según la presente invención contiene un plásmido producido mediante la inclusión de una secuencia que codifica el polipéptido dentro de un plásmido pIGDM1, preferiblemente el plásmido pIGCmT7. Preferiblemente, la célula bacteriana según la presente invención es una cepa de *E. coli*. Un especialista también es capaz de utilizar cualquier otro microorganismo determinado disponible para la tecnología como cepa capaz de realizar la expresión.

El tema de la presente invención también son cuerpos de inclusión que contienen el polipéptido definido anteriormente según la presente invención.

El tema de la presente invención también es un procedimiento para la producción de una vacuna oral frente a la enfermedad causada por un pestivirus, especialmente frente a la peste porcina clásica, *caracterizado porque* comprende la transfección de células de *E. coli* con un vector de expresión, la expresión del polipéptido codificado por este vector, el aislamiento de los cuerpos de inclusión que contienen el polipéptido producido usado en la producción de una vacuna, en la que el vector contiene una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica según la presente invención definida anteriormente.

El tema de la presente invención también es la aplicación del polipéptido según la presente invención definida anteriormente para producir una vacuna frente a la enfermedad causada por un pestivirus, especialmente frente a la peste porcina clásica.

El tema de la presente invención también es una vacuna frente a la enfermedad causada por un pestivirus, especialmente frente a la peste porcina clásica, que contiene un antígeno y, posiblemente, un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, *caracterizado porque* el antígeno contiene el polipéptido definido anteriormente según la presente invención, especialmente en forma de cuerpos de inclusión.

ES 2 328 350 T3

El tema de la presente invención también es la aplicación de cuerpos de inclusión según la presente invención para producir una vacuna oral frente a la enfermedad causada por un pestivirus, especialmente frente a la peste porcina clásica.

5 Las vacunas son proteínas apropiadas, cuya expresión se consiguió en células bacterianas de *E. coli* de la cepa BL21(DE3), transformadas con el plásmido de expresión pIGCmT7 que contiene un determinado inserto. Las proteínas se aislaron a partir de las células bacterianas de *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión.

10 Ventajas de la invención

La presente invención posee muchas ventajas sobre aquellas conocidas de las soluciones conocidas a partir del estado de la tecnología. Se ha ideado un procedimiento muy eficaz de inducción de la producción de anticuerpos en membranas mucosas. Debido al hecho de que las infecciones por VPPC se producen a través de las membranas mucosas, el procedimiento apropiado de administrar dicha vacuna es por vía oral, puesto que sólo este tipo de vacunas induce una reacción inmune especialmente potente en el sitio natural de penetración del virus. La vacuna producida es fácil de administrar y carece de los otros aspectos negativos conocidos de preparación y aplicación de las vacunas clásicas, como el alto coste de producción y el peligro de intoxicación hematológica involuntaria durante la vacunación.

20 La expresión del antígeno se produce en células bacterianas. La homogeneidad de la composición producida y, por consiguiente, las dosificaciones precisas, están garantizadas por la simple organización del hospedador seleccionado y la posibilidad de controlar la expresión del antígeno de la vacuna aislado y usado en forma de cuerpos de inclusión.

25 Breve descripción de los dibujos

Las figuras incluidas facilitan la explicación más clara de la naturaleza de la presente invención.

la fig. 1 representa el mapa del plásmido pIGCmT7, donde: ARG ARNt es el gen del ARNt de arginina para los codones AGA y AGG, ORI es el origen de replicación del plásmido pPIGDMI, Cm-R es el gen resistente a cloranfenicol, T7 es un promotor y stop es un terminador de la transcripción.

la fig. 2 representa un electroforograma de la proteína E2 aislada del VPPC carente del fragmento transmembrana en forma de cuerpos de inclusión. Carriles: 1) Patrones de proteínas de bajo peso molecular 14,4 kDa, 20,1 kDa, 30,0 kDa, 43,0 kDa, 67,0 kDa y 97,0 kDa; 2) proteína E2 aislada del VPPC carente del fragmento transmembrana en forma de cuerpos de inclusión.

la fig. 3 representa una composición proteica administrada a ratones. Carriles: 1) patrones de proteínas de bajo peso molecular 14,4 kDa, 20,1 kDa, 30,0 kDa, 43,0 kDa, 67,0 kDa y 97,0 kDa; 2) y 3) proteína E2 aislada del VPPC carente del fragmento transmembrana; 4-7) muestras de albúmina con las siguientes masas 1 μg , 2 μg , 4 μg y 6 μg de proteína pura; 8) proteína E2 aislada del VPPC sin fragmento transmembrana en forma de cuerpos de inclusión.

la fig. 4 representa la secuencia BresciaE2_Bez_Mem_N que codifica la proteína E2 del VPPC carente del fragmento transmembrana. El fragmento se inserta en el vector pBluescript SK(-) en los sitios de digestión de las nucleasas de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

la fig. 5 representa la secuencia BresciaE2_Bez_Mem_N que codifica la proteína E2 del VPPC carente del fragmento transmembrana. El fragmento se inserta en el vector pIGCmT7 en los sitios de digestión de las nucleasas de restricción *Nde*I y *Hind*III.

la fig. 6 representa los resultados del ensayo de inmunogenicidad del antígeno E2 del VPPC procedente de una cepa transformada de *E. coli*. Los ratones (BALB/c) fueron inyectados dos veces, por vía subcutánea e intramuscular. La dosis de refuerzo se aplicó por vía intravenosa. Cada vez se aplicaron aproximadamente 20 μg de antígeno E2 con adyuvante completo de Freund.

la fig. 7 representa los resultados de un ensayo para la presencia de anticuerpos de clase IgG en suero de ratones alimentados con cuerpos de inclusión que contenían aproximadamente 10 μg del antígeno E2 del VPPC. El antígeno se administró los días 0 y 26 del experimento.

la fig. 8 representa los resultados de un ensayo para la presencia de anticuerpos de clase IgA en las heces de ratones alimentados con cuerpos de inclusión que contenían aproximadamente 10 μg del antígeno E2 del VPPC.

la fig. 9 representa los resultados de un ensayo para la presencia de anticuerpos de clase IgG en suero de ratones alimentados con cuerpos de inclusión que contenían aproximadamente 50 μg del antígeno E2 del VPPC. El antígeno se administró los días 0 y 26 del experimento.

la fig. 10 representa los resultados de un ensayo para la presencia de anticuerpos de clase IgA en las heces de ratones alimentados con cuerpos de inclusión que contenían aproximadamente 50 μg del antígeno E2 del VPPC.

ES 2 328 350 T3

A continuación se muestran ejemplos de realizaciones de la presente invención definida anteriormente.

Ejemplo 1

5 *Producción de una cepa de E. coli que expresa los antígenos de la vacuna*

Plásmidos

10 Plásmido pIGCmT7 de expresión en bacterias: el plásmido pIGCmT7 (4.056 pb) (fig. 1) se produjo en el laboratorio del Prof. Andrzej Plucienniczak en el Instituto de Biotecnología y Antibióticos en Varsovia, basado en el plásmido pIGDM1 (Mikiewicz D. y col., Plasmid 1997), que es un plásmido del grupo ColE1 de *Enterobacter agglomerans*. El plásmido pIGCmT7 se produjo mediante la adición de un gen de resistencia a cloranfenicol, un polienlazador con el promotor de la ARN polimerasa del fago T7 y una secuencia de codon de terminación de la transcripción del fago T7.

15 Plásmidos bacterianos sin expresión: para clonar fragmentos de ADN tras la amplificación por PCR, se usó el plásmido pBluescript SK(-) de Stratagene (la secuencia está disponible en Gene Bank con el número de acceso X52324 S52394). Este plásmido posee: un origen de replicación Col E1, promotores para las ARN polimerasas de los fagos T3 y T7 que flanquean el polienlazador y un gen de resistencia a ampicilina.

20 *Secuencias del inserto inicial*

Secuencia del antígeno E2 de la cepa Brescia del virus de la peste porcina

25 La secuencia nucleotídica que codifica el antígeno E2 de la cepa Brescia del virus de la peste porcina, de 1.504 pb de longitud, clonado en los sitios de restricción *PstI* y *KpnI* en el plásmido pEVhis13HCVE1 se obtuvo del Prof. Szewczyk de la Universidad de Gdansk. La secuencia está disponible en Gene Bank con el número de acceso M31768.

Indicaciones para la producción de los insertos en los vectores

30 Las coordenadas proporcionadas en las descripciones de producción de fragmentos incluidos en vectores se refieren a las coordenadas en la secuencia del antígeno E2 depositada en el American Gene Bank.

35 Indicaciones para la producción del fragmento BresciaE2_Bez_Mem_N insertado en el vector de expresión pIGCmT7.

A partir de un plásmido que contiene la secuencia nucleotídica completa del antígeno E2 del VPPC, se amplificó un fragmento de 1.023 pb de longitud, del pb 2.428 al 3.450, mediante PCR. Los cebadores, BRESAMA y UBI-BREK2, se diseñaron en función de la secuencia del gen que codifica la proteína E2 del VPPC carente del fragmento 40 transmembrana. El cebador sentido, BRESAMA, introduce un cambio en la secuencia nucleotídica del extremo 5' de la molécula de ADN, intercambiando la guanina 2.430 por timina. El cambio introducido en la secuencia nucleotídica no produce cambio en la secuencia nucleotídica. Adicionalmente, el cebador BRESAMA elonga el extremo 5' de la molécula de ADN, introduciendo un codon GCA de alanina y los sitios de reconocimiento para las nucleasas de restricción *NdeI* y *BamHI*. El cebador UBIBREK2 elonga el extremo 3' de la molécula de ADN introduciendo un 45 codon de terminación TA y sitios de reconocimiento para las nucleasas de restricción *HindIII* y *XhoI*. Tras la PCR, la mezcla se separó electroforéticamente en un gel de poliacrilamida. El fragmento de AND amplificado, 1.058 pb de longitud, se eluyó del gel de poliacrilamida y, a continuación, se digirió con las nucleasas de restricción *BamHI* y *HindIII* y se desproteinizó. El fragmento obtenido se ligó al vector pBluescript SK(-) digerido con las mismas nucleasas de restricción y posteriormente desproteinizado. El producto de este ligamiento se usó para transformar células de 50 *E. coli* de la cepa DH5 α . Tras el aislamiento del ADN del plásmido de las células de *E. coli* transformadas, se usó un análisis de restricción para confirmar la presencia del inserto BresciaE2_Bez_Mem_N. La precisión de la secuencia del fragmento BresciaE2_Bez_Mem_N incluido en el vector pBluescript SK(-) se confirmó mediante secuenciación.

A partir del vector pBluescript SK(-) que contenía el inserto clonado, se digirió un fragmento usando las nucleasas 55 de restricción *NdeI* y *HindIII*. Tras la digestión, la mezcla se separó en un gel de poliacrilamida y el fragmento correspondiente al inserto BresciaE2_Bez_Mem_N digerido con las nucleasas de restricción *NdeI* y *HindIII* se escindió y eluyó. El fragmento de ADN obtenido se ligó al vector de expresión pIGCmT7 digerido con las nucleasas de restricción *NdeI* y *HindIII*. El producto de ligamiento se usó para transformar células de *E. coli* de la cepa DH5 α . Tras el aislamiento del ADN del plásmido de las células de *E. coli* transformadas, se usó un análisis de restricción para confirmar 60 la presencia del inserto BresciaE2_Bez_Mem_N. La precisión de la secuencia del fragmento BresciaE2_Bez_Mem_N incluido en el vector pIGCmT7 se confirmó mediante secuenciación.

Las células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3), se transformaron con el plásmido que contenía el inserto confirmado.

65 *Transformación de las células de E. coli*

El procedimiento usado fue la transformación de células bacterianas de *E. coli* competentes, como describieron J. Sambrook y col.

ES 2 328 350 T3

Preparación de cuerpos de inclusión y antígenos de vacuna

Expresión y aislamiento de los cuerpos de inclusión

5 Las bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3) que portaban el plásmido apropiado se cultivaron en medio LB con cloranfenicol (20 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C durante 3 horas y, a continuación, se diluyeron con medio LB recién preparado (1:100). Después de 3 horas de agitación a 37°C, se indujo la expresión mediante la adición de isopropil-tio- β -D-galactósido (IPTG, a una solución final de 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Después de 3 horas las bacterias se centrifugaron. El sedimento de células se resuspendió en tampón de lisis (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, EDTA 0,01 M, 2-mercaptoetanol
10 0,005 M y 0,35 mg/ml de lisozima) y se incubó durante 30 minutos a 20°C. Se añadió Triton X-100 hasta alcanzar una concentración del 1%. La suspensión se sonicó y se centrifugó. El sedimento de cuerpos de inclusión se resuspendió dos veces en tampón PBS que contenía Triton X-100 al 1%, se sonicó y centrifugó. Los cuerpos de inclusión aislados se lavaron dos veces con tampón PBS. Los cuerpos de inclusión resultantes se resuspendieron en tampón PBS.

15 *Análisis de los cuerpos de inclusión purificados*

La presencia de una fracción pura de cuerpos de inclusión se confirmó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% (PAGE-SDS). Las proteínas se visualizaron con colorante azul de Coomassie.

20 Las imágenes de la electroforesis de las muestras de los cuerpos de inclusión aislados se presentan en la fig. 2.

Determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína

25 La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a $\lambda=595$ nm usando el reactivo de Bradford.

Cebadores y oligonucleótidos para la PCR

Los cebadores usados para amplificar los fragmentos de ADN usados se solicitaron a la empresa Perkin Elmer, donde también se fabricaron.

30

Nombre: BRESAMA

35 5'-GAG GGG ATC CAT ATG GCA CGT CTA GCC TGC AG GA GAT-

Nombre: UBIBREK2

40 5'-AA AGC TTC TCG AGT TAT TCT GCG AG TA TCT GAG TG-

Aparatos y demás material:

45 Enzimas usada para la clonación: ADN polimerasa Taq y tampón (Roche, kit Expand Long Template PCR System, N° Cat. 1 681 834; ADN ligasa del fago T4 y tampón (USB); polinucleótido cinasa de T4 y tampón (USB).

Se usaron nucleasas de restricción disponibles en el mercado.

50 PCR: Termociclador de PCR controlador térmico programable PTC-100™ de MJ Research, Inc.

Secuenciación: secuenciador Visible Genetics, Inc.; kit de secuenciación de Amersham, N° Cat. US79840 (según las indicaciones del fabricante); kit de purificación de ADN plasmídico de Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne.

55 Determinación de la concentración de proteína: espectrofotómetro Philips PU 8730.

Documentación: sistema de documentación de geles Sony Digital Graphics Printer UP 0890 y programa *Grab it*.

Cepas bacterianas: las cepas de *E. coli* usadas en el trabajo son:

60 NM522 *supe thi* Δ (*lac-proAB*) *hsd5 F'*[*proAB*⁺ *lacI*^h *lacZ* Δ M15]

DH5 α *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

65 BL21(DE3) *hsdS gal* (λ clts857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gen 1*)

BZ37 *dam*⁻ *dcm*⁻

Las secuencias de los insertos añadidos a los vectores se presentan en las fig. 4 y 5.

ES 2 328 350 T3

En la secuencia se han subrayado los sitios de reconocimiento de las nucleasas de restricción y, tras la digestión con dichas enzimas, el inserto se introdujo en el vector. Los codones de inicio y terminación se muestran en negrita.

5 Ejemplo 2

Inmunogenicidad del antígeno E2 del VPPC de la cepa de Escherichia coli transformada

Purificación del antígeno E2

10

Los cuerpos de inclusión que contenían el antígeno E2 se aislaron a partir de la cepa de *E. coli* transformada según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

15

Los cuerpos de inclusión aislados se separaron en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS (PAGE-SDS). Se realizó una transferencia de 24 horas de las proteínas en una membrana de PVDF (Immobilon TM-P de MILLIPORE). A continuación, el fragmento de la membrana de PVDF se unió a la proteína E2 del VPPC carene del fragmento transmembrana. La proteína se eluyó de la membrana en tampón de elución (Triton X-100 al 1%, SDS al 1% en Tris HCl 50 mM, pH 9,5) a la cual se añadieron 4 volúmenes de acetona y 1 volumen de tampón de elución. El volumen final se dejó a -20°C. Después de 12 horas, la mezcla se centrifugó y el precipitado resultante se secó. Durante la última etapa, las proteínas se resuspendieron en solución salina fisiológica.

20

La pureza y concentración de la preparación de proteína administrada mediante inyección a los ratones se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida en comparación con una solución de albúmina de concentración conocida (fig. 3, carriles 2-7).

25

Inmunización de los ratones

30

El experimento se realizó en hembras de 10 semanas de la cepa endogámica BALB/c (Laboratorio de Genética y Cría de Animales, Centro de Oncología, Varsovia). Se inocularon tres ratones por vía subcutánea e intramuscular dos veces con aproximadamente 20 µg del antígeno E2 con adyuvante completo de Freund, con un intervalo de 2 semanas. Un mes después de la segunda inyección, se administró una dosis de refuerzo intravenosa (aproximadamente 20 µg de antígeno E2 + adyuvante completo de Freund).

35

Análisis de sangre para la presencia de anticuerpos específicos de antígeno

40

Se extrajo sangre de la vena caudal 7 y 9 días después de la dosis de refuerzo usando heparina (Sigma) como anticoagulante. Los sueros obtenidos mediante centrifugación se congelaron en alícuotas a -20°C.

45

El análisis en los sueros de la presencia de anticuerpos frente al antígeno E2 se realizó usando un ELISA. Las placas se cubrieron con antígeno E2 de la cepa Brescia del VPPC carente del fragmento transmembrana (TM-) obtenido en un sistema de baculovirus (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de Gdansk). Las placas MaxiSorp (Nunc) se recubrieron con el antígeno a una concentración de 3 µg/ml. Los sueros se analizaron a una dilución 1:10. El control negativo se realizó usando los sueros de ratones no inmunizados a una dilución 1:10. El control positivo se realizó usando el sobrenadante de cultivos de un hibridoma que producía anticuerpos monoclonales (AcMo) frente a E2 (Laboratorio de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología y Antibióticos, Varsovia). El AcMo frente al antígeno E2 se produjo usando el producto de baculovirus (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de Gdansk).

50

La placa se desarrollo usando anticuerpos frente a IgG de ratón, específicos para la cadena γ y marcados con HRP (Sigma) a una dilución de 1:1.000. Se usó TBM (Sigma) como sustrato de la HRP. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,5 M. La absorbancia de las muestras se midió a 450 nm.

55

Resultados

60

El antígeno E2 del VPPC, aislado de la cepa de *E. coli* transformada y administrado por vía parenteral, inducía una respuesta inmune en todos los ratones, como demostraba la presencia de anticuerpos IgG específicos de antígeno en los sueros (fig. 6). Los resultados obtenidos de la aplicación de un procedimiento de vacunación convencional demuestran que:

65

- el antígeno E2 producido mediante sobreexpresión en *E. coli*, carente del fragmento transmembrana es un inmunógeno activo, al igual que el antígeno E2 (TM-) soluble producido en el sistema de baculovirus (Ficinska J. y col. 1999),

- la glucosilación no es un requisito previo para este inmunógeno (las proteínas recombinantes producidas en sistemas bacterianos no están glucosiladas).

ES 2 328 350 T3

Los anticuerpos presentes en el suero de ratones inmunizados por vía parenteral con el antígeno E2 aislado de la cepa de *E. coli* transformada reaccionan en un ensayo de ELISA con el producto de baculovirus, exactamente igual que los anticuerpos monoclonales producidos usando el producto de baculovirus (fig. 6). La reactividad indicada de los anticuerpos sugiere que son activos frente al antígeno E2 nativo del VPPC.

Los experimentos realizados demuestran que el antígeno E2 recombinante producido por medio de la sobreexpresión en *E. coli* es un inmunógeno válido y puede aplicarse como antígeno para vacuna.

Ejemplo 3

Eficacia de la inmunización oral usando aproximadamente 10 µg de antígeno E2 del VPPC contenido en cuerpos de inclusión

Producción de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión que contenían el antígeno E2 se aislaron a partir de la cepa de *E. coli* transformada según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Inmunización de los ratones

Se inmunizó a un grupo de ratones (tres hembras de 10 semanas) de la cepa endogámica BALB/c (Laboratorio de Genética y Cría de Animales, Centro de Oncología, Varsovia) mediante la administración de una suspensión de cuerpos de inclusión que contenía 20 µg de proteína junto con su pienso, de los cuales aproximadamente 10 µg estaban compuestos por el antígeno E2. Se usaron dos dosis, con un intervalo de 26 días. El grupo control estaba compuesto de tres ratones sin inmunizar.

Detección de anticuerpos específicos de antígeno

El material de investigación era sangre y heces recogidas en paralelo de los ratones inmunizados y control. La sangre se extrajo de la vena caudal 2 días antes de la inmunización, 14 días después de la primera alimentación y 10, 20 y 30 días después de la segunda alimentación con los cuerpos de inclusión. El suero se obtuvo mediante centrifugación del hematocrito usando heparina (Sigma) como anticoagulante. Hasta su análisis, las muestras se conservaron congeladas en alícuotas a -20°C.

Las heces se recogieron cada 3-6 días durante todo el mes siguiente a la segunda dosis de antígeno. Para resuspender las heces, se usó un tampón que contenía inhibidores de proteasas (AEBSF, aprotinina, leupeptina y bestatina). La cantidad de tampón usada era proporcional a la cantidad de heces recogida. Tras la centrifugación, el sobrenadante se congeló en alícuotas a -20°C.

En las muestras de suero y heces se analizó la presencia de anticuerpos frente a E2 usando un ELISA, recubriendo las placas con antígeno E2 de la cepa Brescia del VPPC carente de fragmento transmembrana obtenido a partir del sistema de baculovirus (Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de Gdansk). Los sueros de los ratones inmunizados y control, diluidos 1:10, se analizaron en placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con el antígeno a una concentración de 3 µg/ml. El control positivo era el suero de ratones inmunizados por vía parenteral con el antígeno E2 aislado de los cuerpos de inclusión (Ejemplo 2) con el nivel más bajo de anticuerpos (ratón 1, fig. 6). Para detectar los anticuerpos unidos al antígeno, se usaron anticuerpos frente a anticuerpos de clase IgG de ratón, que eran específicos de la cadena γ, marcados con HRP (Sigma) a una dilución de 1:500. Las muestras preparadas a partir de las heces de ratones inmunizados y control se analizaron a una dilución 1:1 en placas recubiertas con antígeno E2 a una concentración de 5 µg/ml. Las placas se desarrollaron usando anticuerpos frente a anticuerpos de clase IgA de ratón (específico de la cadena α) conjugados con HRP (Sigma). El anticuerpo secundario se diluyó a 1:500. En ambos ELISA se usó TBM como sustrato de la peroxidasa. La reacción se detuvo mediante la adición de una solución de H₂SO₄ 0,5 M y la absorbancia se midió a λ=450 nm.

Resultados

Los sueros de los ratones inmunizados, obtenidos de la sangre recogida 14 días después de la primera y 10, 20 y 30 días después de la segunda administración oral de aproximadamente 10 µg del antígeno E2 contenido en cuerpos de inclusión, no muestran una reacción específica al antígeno en el ensayo de ELISA para la presencia de anticuerpos de clase IgG (fig. 7). Tampoco se apreció en las heces de los ratones alimentados con cuerpos de inclusión la presencia de anticuerpos, en este caso, de clase IgA de anticuerpos frente al antígeno E2 (fig. 8). De este modo, en el experimento realizado, no se apreciaba una respuesta sistémica del sistema inmunitario al antígeno administrado, ni tampoco una respuesta inmune de membranas mucosas.

Las condiciones de una inmunización oral eficaz no están tan estrictamente definidas como lo están para la inmunización parenteral, en la que el uso de un procedimiento convencional facilita la inducción de una respuesta inmune como en el experimento descrito en el Ejemplo 2. Tanto en la inmunización parenteral como en la oral, se usó el antígeno procedente de la cepa de *E. coli* transformada. Por tanto, la causa del fracaso no era la incapacidad del antígeno recombinante para inducir una respuesta inmune, sino la aplicación de una pauta de inmunización ineficaz.

Ejemplo 4

Eficacia de la inmunización oral usando aproximadamente 50 µg de antígeno E2 del VPPC contenido en cuerpos de inclusión

Producción de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión que contenían el antígeno E2 se aislaron a partir de la cepa de *E. coli* transformada según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, según el procedimiento de aislamiento.

Inmunización de los ratones

Los experimentos se realizaron en hembras de 10 semanas de la cepa endogámica BALB/c (Laboratorio de Genética y Cría de Animales, Centro de Oncología, Varsovia). Se inmunizaron tres ratones dos veces con un intervalo de 26 días, administrándose cada vez una suspensión de cuerpos de inclusión con el alimento, que contenía 100 µg de proteína, de los cuales el antígeno E2 constituía aproximadamente 50 µg. Tres ratones sin inmunizar constituían el grupo control.

Detección de anticuerpos específicos de antígeno

La sangre se extrajo de la vena caudal 2 días antes de la inmunización, 14 días después de la primera alimentación y 10, 20 y 30 días después de la segunda alimentación con los cuerpos de inclusión que contenían el antígeno E2. Las heces se recogieron cada 3-6 días durante todo el mes siguiente a la segunda dosis de antígeno. Se prepararon las muestras para su análisis y se analizó la presencia de anticuerpos específicos de antígeno según el protocolo descrito en el Ejemplo 3. El análisis estadístico de los datos se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney. No se detectaron anticuerpos IgG específicos de antígeno en los sueros de ratones alimentados con cuerpos de inclusión que contenían aproximadamente 50 µg del antígeno E2 del VPPC (fig. 9). La reactividad de las muestras de suero procedente de la sangre recogida 14 días después de la primera inmunización, así como de 10, 20 y 30 días después de la segunda administración del antígeno, no difería de las muestras recogidas 2 días antes de la inmunización y de los sueros de los ratones control.

La reactividad de las muestras de heces de los ratones inmunizados, que se recogieron de 6 a 20 días después de la segunda dosis de antígeno, era significativamente ($p < 0,001$) mayor que en los extractos de las heces de los ratones control (fig. 10). Del mismo modo, el análisis estadístico de los datos obtenidos de cada ratón inmunizado mostraba un aumento significativo de la reactividad de las muestras tomadas de las heces de los ratones inmunizados 1, 2 y 3 (fig. 10) en relación con los tres ratones control (ratón 1, $p = 0,025$; ratón 2, $p < 0,01$, ratón 3, $p = 0,001$). La reactividad máxima de las muestras, observada en las muestras de heces recogidas 6 días después de la segunda dosis era, individualmente, 1,8, 2,2 y 3,7 veces superior a la reactividad promedio observada en el grupo control. Por tanto, el ensayo de ELISA demostró la presencia de anticuerpos de clase IgA frente al antígeno E2 del VPPC en las heces de todos los animales inmunizados. La capacidad para detectar estos anticuerpos usando placas recubiertas con antígeno E2 producido en el sistema de baculovirus sugiere la reactividad de los anticuerpos producidos con un antígeno nativo del VPPC.

Los resultados obtenidos demuestran que los anticuerpos de clase IgA se producían en el tubo digestivo de los ratones inmunizados podían detectarse, posteriormente, en sus heces. La producción de estos anticuerpos tenía un patrón característico, similar en todos los animales inmunizados (fig. 10). Los primeros anticuerpos producidos aparecían en las heces de los animales inmunizados entre el 3^{er} y el 6^o día tras la segunda dosis de antígeno. Tras llegar a un máximo, el nivel disminuía de modo que 30 días después de la inmunización no eran detectables mediante ELISA.

Los resultados experimentales indican que la aplicación de dos dosis de 50 µg del antígeno en cuerpos de inclusión induce una respuesta en el sistema inmune de las membranas mucosas del tubo digestivo, evidenciado por la producción de IgA secretada (S-IgA). La falta de niveles detectables de anticuerpos de clase IgG en el suero de los ratones no es sinónimo de la falta de estimulación de la respuesta inmune sistémica por un antígeno administrado por vía oral. Como demuestra la inmunización parenteral, en muchos casos este sistema sensibiliza de forma eficaz, aunque la producción de anticuerpos es indetectable (Harlow E., Lane D. 1988). A diferencia de la circulación de anticuerpos en el sistema inmunitario sistémico, los anticuerpos producidos por las células plasmáticas de las membranas mucosas tienen una función importante en la inmunidad a enfermedades transmitidas por las membranas mucosas, como la peste porcina. Esto se ha demostrado mediante experimentos como la inmunización oral con antígenos de *Helicobacter pylori* (descripción de la invención WO 95122987, publicada el 31 de agosto de 1995) y otros diversos antígenos bacterianos (McGhee J.R., Kyono, H. 1993). Así, en el experimento realizado, se ha logrado el principal objetivo de la inmunización oral, no conseguida a través de la inmunización parenteral, lo que significa una estimulación del sistema inmune asociado a las membranas mucosas, que podría proteger a estas últimas frente a infecciones. A pesar de la falta de respuesta sistémica discernible, el efecto obtenido de inmunización con el antígeno E2 contenido en los cuerpos de inclusión parece ser preferencial para experimentos como los de vacunas comestibles frente al virus de Norwalk, virus causante de inflamación aguda del estómago e intestino en humanos (Mason H.S. y col. 1996). De los once ratones que reaccionaron con producción de anticuerpos detectados en sangre tras la administración de raíces de patata que expresaban proteínas de la cápside NV (NVCP), sólo un ratón produjo niveles detectables de IgA intestinal.

ES 2 328 350 T3

Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de cuerpos de inclusión para la inmunización de animales a través del tubo digestivo no requiere la formulación de vehículos diseñados específicamente que potencien la absorción del antígeno a través de las células epiteliales y/o protejan al antígeno frente a la degradación en el intestino, ni de adyuvantes (factores usados con frecuencia en experimentos sobre vacunación oral) para provocar una respuesta en el sistema inmunitario de las membranas mucosas. Todo ello apunta a una interesante aplicación de los cuerpos de inclusión que contienen el antígeno E2 como vacunas veterinarias comestibles frente a la peste porcina.

Bibliografía

Ficinska J., Szymanski P., Szewczyk B., Bienkowska-Szewczyk K. Expression of CSFV E2 glycoprotein gene in baculovirus system. 1999. *Medycyna weterynaryjna* 55. 677-680

Harlow E., Lane D. 1988. Immunizations [en]: Antibodies. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 53-138

Mason H. S., Ball J.M., Shi J.-J., Jiang X., Estes M.K., Arntzen C.J 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93. 5335-5340

McGhee J.R., Kyono, H. 1993. New perspectives in Vaccine Development: Mucosal immunity to infectious. *Infect Agents Dis.* 2. 55-73

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye sólo para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Incluso aunque se ha puesto un gran cuidado en la recopilación de las referencias, no podemos excluir errores u omisiones y la EPO se exime de toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0037610 A [0004]
- PL 174448 [0007]
- US 5770214 A [0006]
- WO 9832427 A [0009]
- US 5811105 A [0006]
- US 6207165 B [0016]
- US 5804194 A [0006]
- US 5965134 A [0017]
- US 6290962 B [0007]
- WO 9522987 A [0070]
- PL 179149 [0007]
- PL 358082 [0079]

Bibliografía distinta a las patentes citada en la descripción

- **Terpstra** y col. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1990, vol. 97 (2), 77-9 [0002]
- **Meyers** y col. *J. Virol.*, 1996, vol. 70 (3), 1588-95 [0002]
- van **Rijn** y col. *Vaccine*, 1999, vol. 17 (5), 433-40 [0002]
- **Weiland** y col. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 3677 [0003]
- van **Rijn** y col. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 3934 [0003]
- **Richter L.; Kipp B.B.** *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 1999, vol. 240, 159-176 [0004]
- **Tacket C.O.; Mason H.S.** *Microbes and Infection*, 1999, vol. 1, 777-783 [0011]
- **Makela P.H.** *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, vol. 24, 9-20 [0011]
- **Richter L; Kipp B.B.** *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 1999, vol. 240, 159-176 [0012]
- **Mikiewicz D.** y col. *Plasmid*, 1997 [0036]

ES 2 328 350 T3

• **Ficinska J.; SzymanSki P.; Szewczyk B.; Bienkowska-Szewczyk K.** Expression of CSFV E2 glycoprotein gene in baculovirus system. *Medycyna weterynaryjna*, 1999, vol. 55, 677-680 [0078]

5 • **Harlow E.; Lane D.** Immunizations [en]: Antibodies. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988, 53-138 [0078]

10 • **Mason H. S.; Ball J.M.; Shi J.-J.; Jiang X.; Estes M.K.; Arntzen C.J.** Expression of Norwalkvirus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 5335-5340 [0078]

15 • **McGhee J.R.; Kyono, H.** New perspectives in Vaccine Development: Mucosal immunity to infectious. *Infect Agents Dis.*, 1993 vol. 2 , 55-73 [0078]

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 350 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido en forma de cuerpos de inclusión producido en un organismo genéticamente modificado que contiene la secuencia de aminoácidos de la proteína E2 de pestivirus, preferiblemente del VPPC, carente del fragmento transmembrana.
- 10 2. Un polipéptido de la reivindicación 1 que contiene la secuencia codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Una célula bacteriana transformada con la construcción de expresión que contiene la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína E2 de pestivirus, preferiblemente del VPPC, carente del fragmento transmembrana.
- 20 4. Una célula bacteriana de la reivindicación 3 que contiene la construcción que contiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 25 5. Una célula bacteriana de la reivindicación 3 que es una cepa de *E. coli*.
- 30 6. Cuerpos de inclusión purificados que contienen un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la proteína E2 de pestivirus, preferiblemente del VPPC, carente del fragmento transmembrana.
- 35 7. Cuerpos de inclusión purificados de la reivindicación 6 que se producen en *E. coli*.
- 40 8. Cuerpos de inclusión purificados según la reivindicación 6, **caracterizados** porque el polipéptido contiene la secuencia codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 45 9. Un procedimiento para la producción de una vacuna oral frente a una enfermedad causada por un pestivirus, preferiblemente la peste porcina clásica, **caracterizado** porque comprende la transformación de células de *E. coli* con un vector de expresión, la expresión de un polipéptido codificado por este vector, el aislamiento de los cuerpos de inclusión que contienen el polipéptido producido que sirve para preparar una vacuna, en el que el vector contiene la secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la proteína E2 de pestivirus, preferiblemente del VPPC, carente del fragmento transmembrana.
- 50 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la secuencia nucleotídica mencionada es la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 55 11. Uso del polipéptido en forma de cuerpos de inclusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la preparación de una vacuna frente a una enfermedad causada por un pestivirus, preferiblemente frente a la peste porcina clásica.
- 60 12. Una vacuna oral frente a una enfermedad causada por un pestivirus, preferiblemente frente a la peste porcina clásica, que contiene el antígeno y, posiblemente, un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente permitido, **caracterizada** porque el antígeno contiene un polipéptido purificado que contiene la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la proteína E2 de pestivirus, preferiblemente del VPPC, carente del fragmento transmembrana.
- 65 13. Una vacuna según la reivindicación 12, **caracterizada** porque el polipéptido se produce en un organismo hospedador procariota genéticamente modificado.
- 70 14. Una vacuna según la reivindicación 12, **caracterizada** porque el polipéptido está en forma de cuerpos de inclusión.
- 75 15. Una vacuna según la reivindicación 12, **caracterizada** porque el polipéptido contiene la secuencia codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 80 16. Uso de los cuerpos de inclusión purificados según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para la preparación de una vacuna oral frente a una enfermedad causada por un pestivirus, preferiblemente frente a la peste porcina clásica.

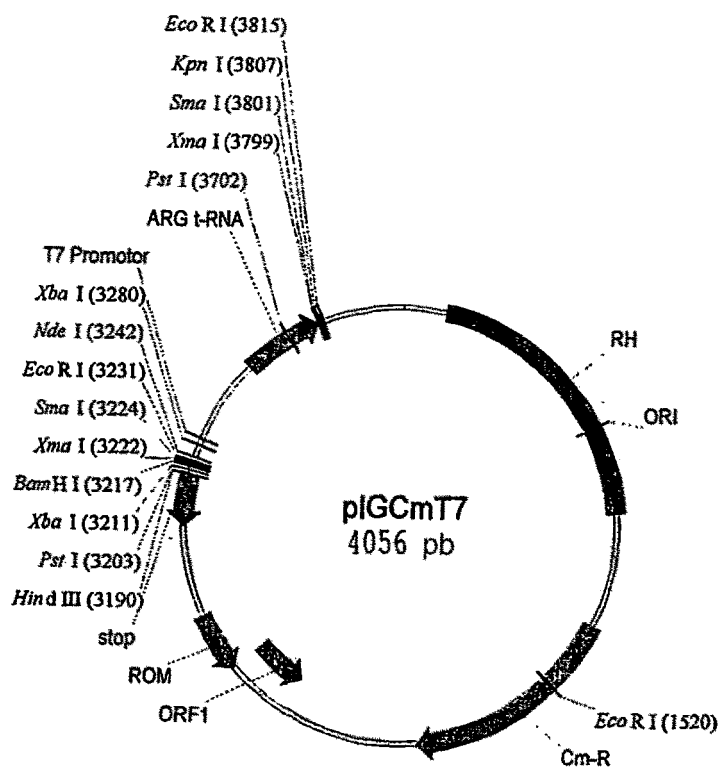


Fig. 1

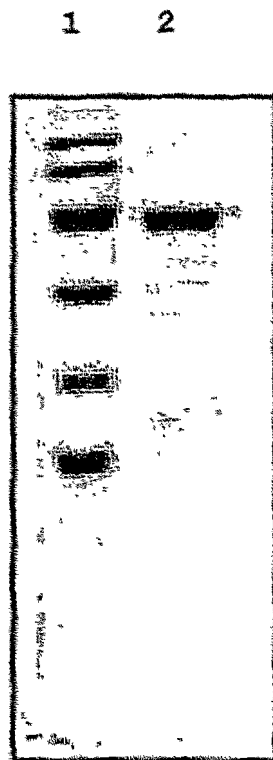


Fig. 2

1 2 3 4 5 6 7 8

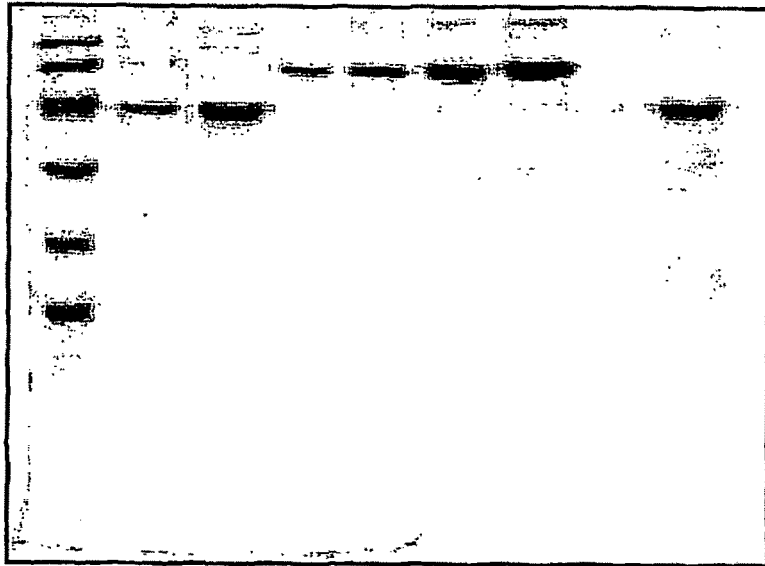


Fig. 3

*Bam*HI

ggatccatatggcactctagcctgcaggagatcacaggtacgctatacacaccatgagataggctacatgggcccgaggctcactaccacc
 tggagatacaccacatttgcactggatgatggaccgtcaggccatctgcatggcaggttcctttagtcacagcacttatgtggttagtaggagg
 tatctggcatcattacataggacgctttaccacttccgtgacattcgagctcctgttcgacgggaccagcccattgaccgggatgggagatga
 ctccgggttcggactgtgtccgtatgatacagagccctgtagtcagggatacacacacaccttgttgatgtagtgcattctaccctagttgcccata
 ggggtggaccgggtgtatagagtgcacggcagtgagcccgacactctgagacagagtggtagaccttcagagagagacccttccgtaacagagggga
 ttgtgtgaccactacagtggtgagatctattctactgtatggggggccattggacatgtgtgaggtgaccagtgacctacacgggggggccagt
 acatgcagatgggtggcttcgacttcatgagcctgacggactcccacactaccccataggtagtgcattttggcatgagacaggttacagatag
 tggattcacggactgtacagagatggcgttgtatcagcacagaggggagtcagagtgccttgattggtacacactgtcaggtgcatgcattagat
 gagactaggccctatgccatgcaggccctaggagatcgtctctagtgcgggacctgtaggacttccctgtacattcactacgcaactctgaggacag
 gtattatgagcccaggacagctatttccacatatatgctcaggccgagtatcagtactggtttgatctggatgtgaccgaccgcccactcagatt
 acttcgcagatactcgagagcctt

*Hind*III

Fig. 4

NdeI

cata**at**ggcacgtctagcctgcaggagatcacaggtacgctatatcacaccatgagatagggctacatgggcccagggtctc
actaccacctggagatacaccacatttgactggatgatgggaccgtcagccatctgcatggcaggttcctttagtcaca
gcacttatgtggttaggaggtatctggcatcattacatagggacgcttaccacttccgtgacattcgagctcctgtt
cgacgggaccagccattgaccgaggatgggagatgacttcgggttcggactgtgtccgtatgatacgagccctgtagtca
gggatacacacacctgtgtgatggtagtgcaattctacctagtttgcccataggggtggacgggtttatatagagtgcacggca
gtgagcccgcactctgagacagagtggtagacctcagagagagacccttccgtacagagggatgtgtgaccactaca
gtggatgagatctattctactgtatggggggcattggacatgtgtgaggtgaccagtaccacacggggggccagtac
atgcagatggtgtggcttcgacttcatgagcctgacggactcccacactaccataggtagtgcattttggcatgagaca
ggttacagatagtggattcacggactgtacagagatggcgttgatcagcacagaggggagtcatgagtgcttgattggta
cacactgtcaggtgcatgcattagatgagactaggccctatgccatgcaggcctaggagatcgtctctagtcgggacctg
taggacttcctgtacattcactacgcaactctgaggacaggtatattagagccagggacagctatttccacatatatgctc
agggcgagtatcagtactgggttgatctggatgtgaccgaccgcccactcagattactcgcagag**ta**ctcgagagcctt

HindIII

Fig. 5

ES 2 328 350 T3

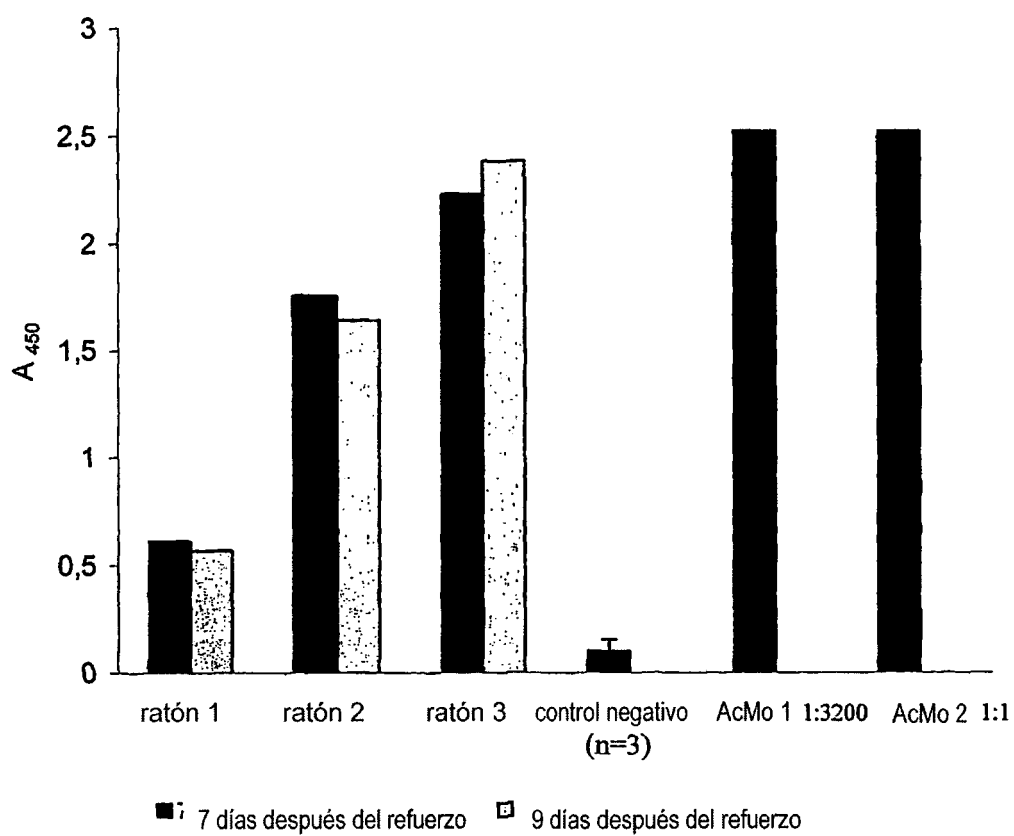


Fig. 6

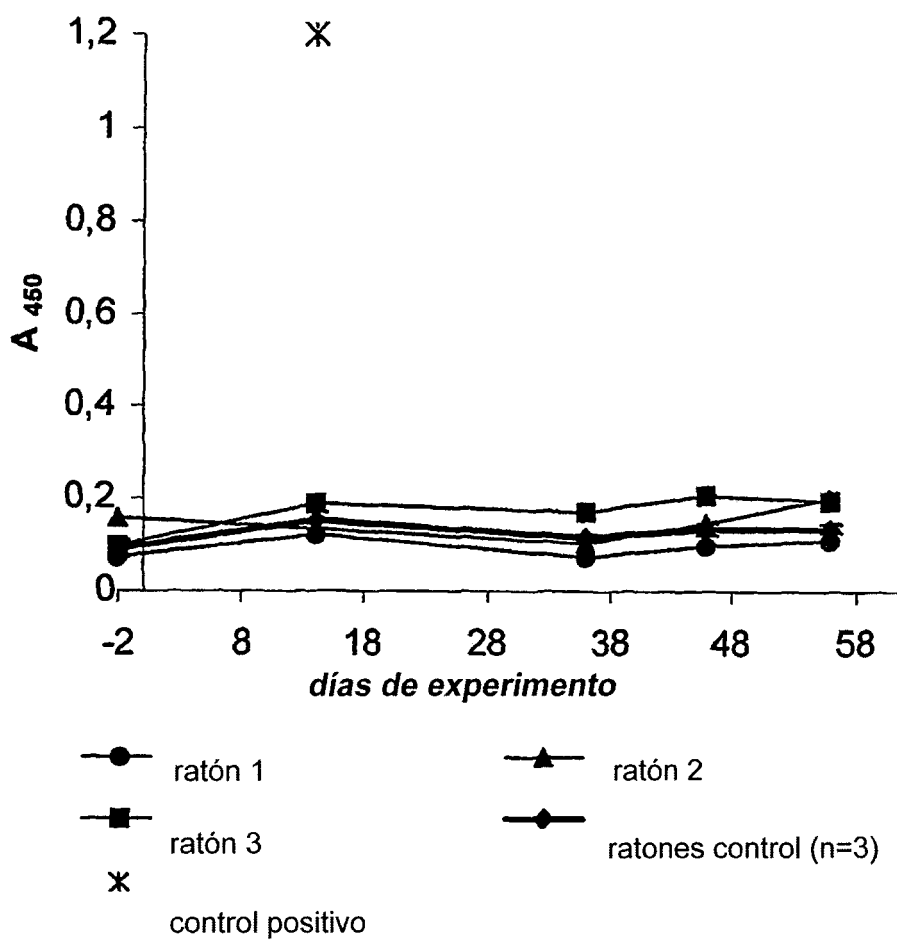


Fig. 7

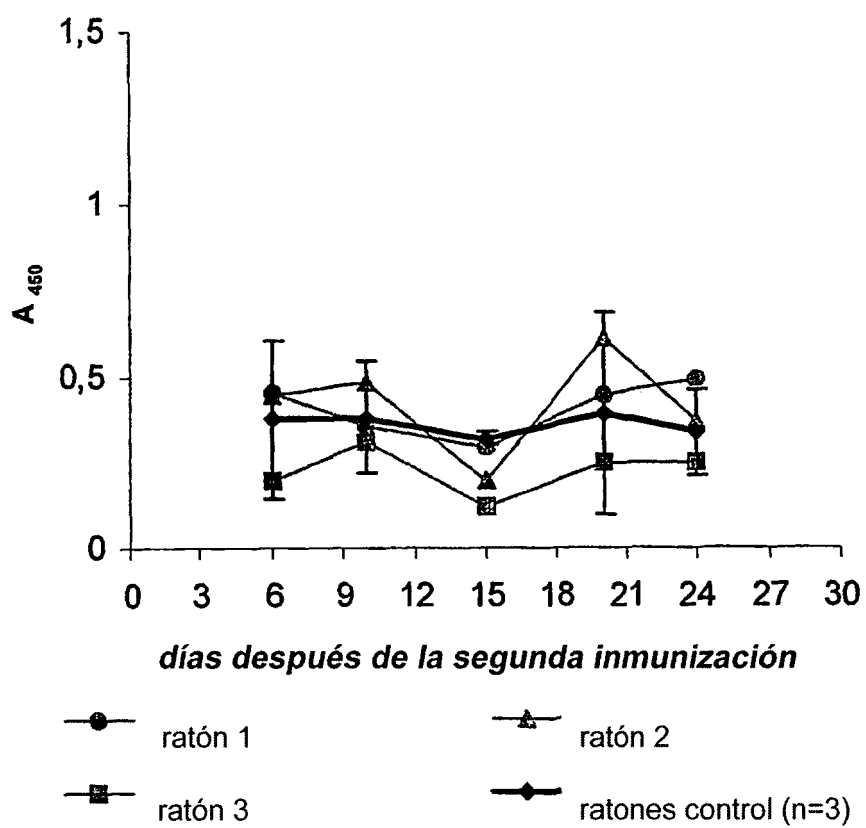


Fig. 8

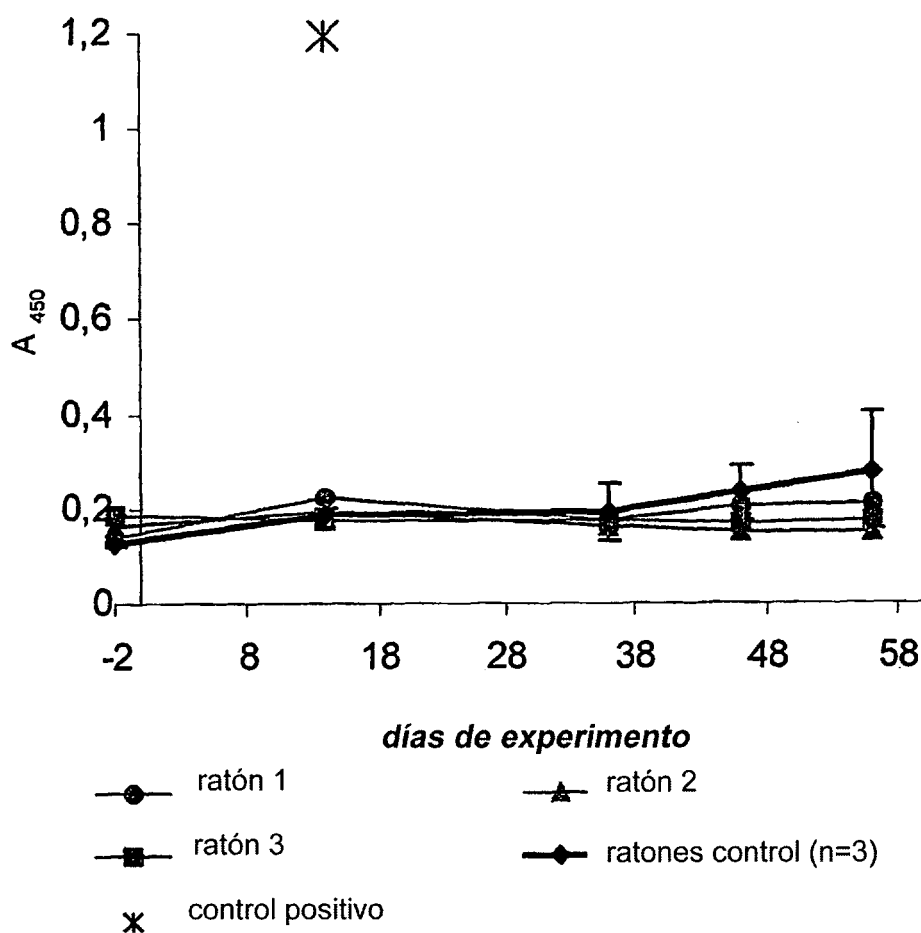


Fig. 9

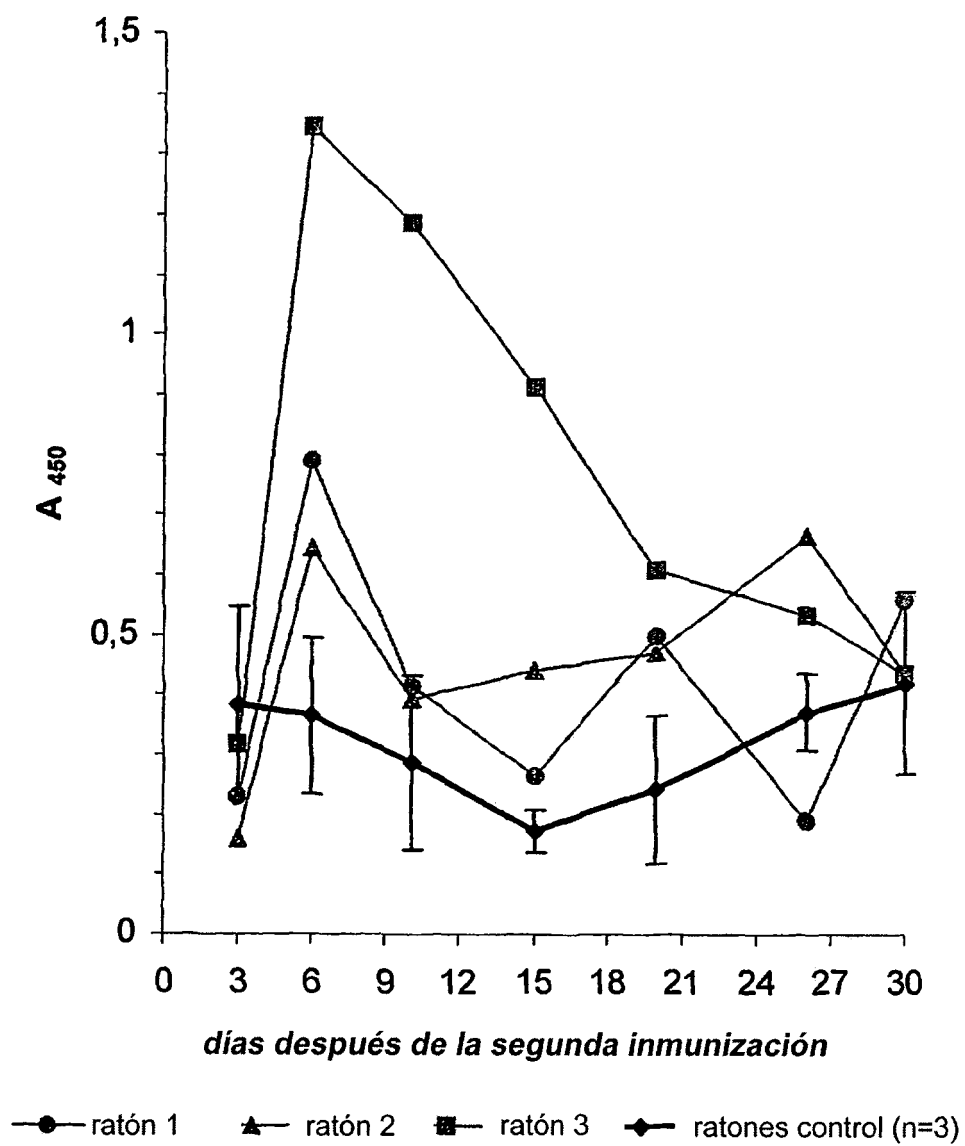


Fig. 10

ES 2 328 350 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTYTUT BIOTECHNOLOGII I ANTYBIOTYKOW UNIWERSYTET GDANSKI

5 <120> Cuerpos de inclusión como antígenos para la vacunación oral de animales

<130> PZ/0061/RW

10 <140> PL 358082

<141> 31/12/2002

15 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1

<211> 973

<212> ADN

<213> sintético

25

<400> 1

```
30      ggatccatat  ggcacgtcta  gcctgcagga  gatcacaggt  acgctatata  acaccatgag      60
      atagggctac  atggggccga  ggtctcacta  ccacctggag  atacaccaca  tttgcactgg      120
      atgatgggac  cgtcaggcca  tctgcatggc  aggttccttt  agtcacagca  cttatgtggt      180
      tagtaggagg  tatctggcat  cattacatag  gacgcctttac  ccacttccgt  gacattcgag      240
      ctccctgttcg  acggggaccag  cccattgacc  gaggatggga  gatgacttcg  ggttcggact      300
      gtgtccggtat  gatacagagcc  ctgtagtcag  ggatacacac  accttggtga  tggtagtgca      360
35      ttctacctag  tttgcccata  ggggtggacgg  gtgttataga  gtgcacggca  gtgagcccga      420
      cactctgaga  cagagtggta  gaccttcaga  gagagaccct  ttccgtacag  agggattgtg      480
      tgaccactac  agtggatgag  atctattcta  ctgtatgggg  gggcattgga  catgtgtgag      540
      gtgaccagtg  acctacacgg  gggggccagt  acatgcagat  ggtgtggctt  cgacttcatg      600
40      agcctgacgg  actcccacac  taccatag  gtagtgcat  ttggcatgag  acaggttaca      660
      gatagtggat  tcacggactg  tacagagatg  gcgttgatc  agcacagagg  ggagtcatga      720
      gtgcttgatt  ggtacacact  gtcaggtgca  tgcattagat  gagactaggc  cctatgcat      780
      gcaggcctag  gagatcgtct  ctagtgcggg  acctgtagga  ctccctgtac  attcactacg      840
      caactctgag  gacaggtatt  atgagcccag  ggacagctat  ttccacatat  atgctcaggg      900
45      cgagtatcag  tactggtttg  atctggatgt  gaccgaccgc  cactcagatt  acttcgcaga      960
      tactcgagag  ctt
```

<210> 2

50 <211> 968

<212> ADN

<213> sintético

55

60

65

ES 2 328 350 T3

<400> 2

	catatggcac	gtctagcctg	caggagatca	caggtacgct	atatcacacc	atgagatagg	60
5	gctacatggg	gccgaggtct	cactaccacc	tggagataca	ccacatttgc	actg gatgat	120
	gggaccgtca	ggccatctgc	atggcaggtt	cctttagtca	cagcacttat	gtggttagta	180
	ggaggatatct	ggcatcatta	cataggacgc	ttaccact	tccgtgacat	tcgagctcct	240
	gttcgacggg	accagcccat	tgaccgagga	tgggagatga	cttcgggttc	ggactgtgtc	300
	cgtatgatac	gagccctgta	gtcagggata	cacacacctt	gttgatggta	gtgcattcta	360
10	cctagtttgc	ccataggtg	gacgggtggt	atagagtgca	cggcagtgag	cccgacactc	420
	tgagacagag	tggtagacct	tcagagagag	accctttccg	tacagagggg	ttgtgtgacc	480
	actacagtgg	atgagatcta	ttctactgta	tgggggggca	ttggacatgt	gtgaggtgac	540
	cagtgacct	cacggggggg	ccagtacatg	cagatggtgt	ggcttcgact	tcatgagcct	600
	gacggactcc	cacactacc	cataggtagt	gcattttggc	atgagacagg	ttacagatag	660
15	tggattcacg	gactgtacag	agatggcggt	gtatcagcac	agaggggagt	catgagtgtc	720
	tgattggtac	acactgtcag	gtgcatgcat	tagatgagac	taggccctat	gccatgcagg	780
	cctaggagat	cgtctctagt	gcgggacctg	taggacttcc	tgtacattca	ctacgcaact	840
	ctgaggacag	gtattatgag	cccagggaca	gctatttcca	catatatgct	cagggcgagt	900
20	atcagtactg	gtttgatctg	gatgtgaccg	accgccactc	agattacttc	gcagatactc	960
	gagagcctt						968

25

30

35

40

45

50

55

60

65